玉米青贮瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的关系

王晓帆　张幸怡　郝小燕　高　红　丁　雪　张永根*　辛杭书*

（东北农业大学动物科学技术学院，哈尔滨 150030）

摘　要：本试验旨在探索玉米青贮瘤胃降解特性与其蛋白质分子结构的相关性，并建立拟合方程。试验采用尼龙袋法测定 11 种玉米青贮的干物质、蛋白质以及中性洗涤纤维的瘤胃降解率，并对其降解特性进行计算，利用傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）技术对玉米青贮样品的蛋白质分子结构（酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带、α–螺旋、β–折叠）进行分析。结果表明，酰胺Ⅱ带的峰高分别与干物质有效降解率（DM_{ED}）极显著相关（r=－0.71，P＜0.01），与中性洗涤纤维慢速降解部分的降解速率（NDF_c）（r=－0.52，P＜0.05）、不可降解部分（NDF_u）（r=－0.46，P＜0.05）显著相关；酰胺Ⅰ带、Ⅱ带的峰高比分别与干物质快速降解部分（DM_a）（r=0.57，P＜0.05）、慢速降解部分（DM_b）（r=－0.55，P＜0.05）显著相关，与蛋白质不可降解部分（CP_u）显著相关（r=－0.50，P＜0.05），与蛋白质有效降解率（CP_{ED}）趋于相关（r=0.38，P＜0.10）；α–螺旋的峰高分别与干物质不可降解部分（DM_u）极显著相关（r=0.59，P＜0.01），与蛋白质快速降解部分（CP_a）显著相关（r=0.45，P＜0.05）；α–螺旋和β–折叠的峰高比与干物质慢速降解部分的降解速率（DM_c）极显著相关（r=0.59，P＜0.01），与蛋白质慢速降解部分的降解速率（CP_c）显著相关（r=0.57，P＜0.05），与 CP_{ED} 显著相关（r=0.43，P＜0.05）；蛋白质分子结构与蛋白质慢速降解部分（CP_b）、中性洗涤纤维快速降解部分（NDF_a）、慢速降解部分（NDF_b）并无相关（P＞0.10）。玉米青贮蛋白质分子结构对 DM_{ED}（R^2=0.50）、CP_{ED}（R^2=0.48）拟合最好。初步证明，可以利用 FTIR 技术分析玉米青贮瘤胃降解特性与其蛋白质分子结构的相关性，并建立回归方程，并利用二者的数量关系对玉米青贮的营养价值进行快速、非破坏分析，从而减少传统化学分析耗时、费力、环境污染等缺点。

收稿日期：2015－12－21

基金项目：国家奶牛产业技术体系项目（CARS-37）；寒区规模化奶牛场奶牛精细饲养与粗饲料高效利用关键技术集成与示范（2012BAD12B05-1）；东北农业大学青年才俊项目（14QC14）

作者简介：王晓帆（1990—），女，黑龙江佳木斯人，硕士研究生，从事反刍动物营养与饲料科学研究。E-mail: wangxiaofan0220@163.com

*通信作者：张永根，教授，博士生导师，E-mail: zhangyonggen@sina.com；辛杭书，副教授，硕士生导师，E-mail：xinhangshu@163.com

关键词：瘤胃降解特性；傅里叶红外光谱技术；蛋白质分子结构；相关性；多元回归

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：1006-267X(2016)00-0000-00

反刍动物的饲养及营养需要要求对反刍动物采食的饲料进行养分利用率的优化，即需要一个简单、快速、精准的方法估测动物饲粮中饲料的营养价值[1-2]。目前主要是对反刍动物采食的饲料进行化学成分、瘤胃降解特性和消化特性的测定。瘤胃降解特性可以影响饲料的营养价值，也可以作为饲粮配方依据以满足动物的能、氮平衡，从而同步瘤胃营养，提高微生物蛋白质的合成和饲料利用率[3]。

Yu 等[4]通过对具有相似化学组成的 2 种类型的大麦（麦芽型大麦和饲用大麦）进行比较，发现二者瘤胃降解程度却不同，麦芽性大麦的降解程度强于饲用型大麦。Liu 等[5]在研究中发现不同品种的大麦虽然化学组成相近，但降解特性却差异显著。由此可见，传统的化学分析方法在处理过程或测定过程中破坏了分子内在结构和理化特性，仅能测定出化学组分的相关信息，无法揭示蛋白质内在分子结构与营养价值以及利用率的关系[6-7]。卢雁等[8]指出，傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）技术是对蛋白质二级结构定量计算的强有力手段。FTIR 分析技术是一种可以揭示饲料生物学分子结构特点的，快速、直接、破坏程度小的分析技术[7,9-13]。由于每个生物组分都有其特定的分子结构信息，所以也存在独特的光谱信息与之对应。例如，蛋白质分子光谱区域分为酰胺Ⅰ带（主要由 80%的 C=O 和 20%的 C—N 伸缩振动组成）和酰胺Ⅱ带（主要由 60%N—H 弯曲振动和 40%的 C—N 伸缩振动组成）[14]。酰胺Ⅰ带中蛋白分子的二级结构主要包含 α–螺旋、β–折叠和少量的 β–转角、无规则卷曲[15-18]。每一个官能团都与样本的营养组分及生物学特性紧密相关。

所以，本文旨在利用 FTIR 技术对玉米青贮进行光谱扫描，在蛋白质区域取得光谱特性，进而与其瘤胃降解特性进行相关及回归分析，并构建预测方程，以探索玉米青贮的蛋白质分子结构特性是否与其瘤胃降解特性存在一定的相关关系。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验所选用的玉米青贮（n=11）采集于 2014 年 5 月至 9 月，采集地点为位于黑龙江省哈尔滨市、齐齐哈尔市、大庆市等的奶牛养殖场，玉米种类见表 1。

采集后的样品经过 65 ℃烘干 48 h，粉碎过 100 目网筛，用于光谱分析；粉碎过 1 mm 网筛，用于化学分析；粉碎过 2 mm 网筛用于瘤胃降解试验。

表 1　试验样品基本信息

Table 1 Basic information of experimental samples

玉米青贮编号 Corn silage No.	产地 Producing area	品种 Variety
1	哈尔滨市（五常）	先玉 335
2	哈尔滨市	阳光 1 号、金岭 17
3	哈尔滨市	金岭 17
4	哈尔滨市	甜玉米
5	齐齐哈尔市（富拉尔基）	大京九 23
6	佳木斯市（富锦）	阳光 1 号
7	大庆市（林甸）	平安 14
8	大庆市（杜尔伯特）	平安 14
9	鸡西市（密山）	中原单 32
10	鸡西市	绥玉 7、垦单 10
11	绥化市（肇东）	豫青 23

1.2 试验动物与饲粮

试验选用 3 头装有永久性瘤胃瘘管的健康荷斯坦奶牛，于东北农业大学香坊实验基地进行瘤胃降解试验。试验牛的饲粮参照我国奶牛饲养标准配制，试验饲粮组成及营养水平见表 2。试验期间每日于 08：00 和 16：00 饲喂饲粮，自由饮水，单槽饲养。

表 2 试验饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 2 Composition and nutrient levels of the experimental diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	13.18
麦麸 Wheat bran	3.74
糖蜜 Molasses	0.99
豆粕 Soybean meal	3.13
干酒糟 Dried distillers grain	5.35
棉籽粕 Cottonseed meal	2.08
玉米纤维饲料 Corn fiber meal	7.42
玉米胚芽粕 Corn germ meal	4.94

预混料 Premix[1)]	0.50
羊草 Chinese wild rye	42.87
玉米青贮 Corn silage	15.80
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
产奶净能 NE_L/(MJ/kg)	5.4
粗蛋白质 CP	14.4
中性洗涤纤维 NDF	49.2
酸性洗涤纤维 ADF	30.6
钙 Ca	0.6

[1)]每千克预混料中含有 Contained the following per kg of the premix：VA 800 000 IU，VD 700 000 IU，VE 10 000 IU，Fe 1 600 mg，Cu 1 500 mg，Zn 10 000 mg，Mn 3 500 mg，Se 80 mg，I 120 mg，Co 50 mg。

[2)]产奶净能[19]为计算值，其余为实测值。NE_L was a calculated value, while the other nutrient levels were measured values.

1.3 试验方法

1.3.1 常规养分的测定指标及方法

干物质（dry matter，DM）、粗蛋白质（crude protein，CP）的测定参照 AOAC[20]的方法，中性洗涤纤维（neutral-detergent fiber，NDF）的测定参照 Van Soest 等[21]的方法。

1.3.2 瘤胃尼龙袋法

根据 Peng 等[22]的瘤胃降解试验方法，称取 7 g 左右粉碎后的试验样品分别放入孔径为 50 μm、大小为 10 cm×20 cm 的已知重量的尼龙袋中，用尼龙绳距袋口 2 cm 处系好，使得每个袋子内的样品占袋子表面积的比例约为 19 mg/cm^2。每种样品称 3 个重复。在饲喂前按照"依次投入，同时取出"的原则，将称好的尼龙袋随机放入规格为 45 cm×45 cm 的瘤胃网兜中，并用 90 cm 长的绳子固定在瘤胃瘘管上，分别培养 72、48、36、24、16、12、8、4、0 h。每头牛、每个时间点瘤胃中尼龙袋的数目不超过 28 个。取出后的尼龙袋（包括 0 h）放在自来水下冲洗，直至水澄清，并在 65 ℃的条件下烘干 48 h 至恒重，记录残渣与尼龙袋的总重，然后粉碎过 1 mm 网筛，于封口袋中保存待测。

1.3.3 中红外光谱的检测

试验采用的仪器为 BRUKER ALPHA 中红外光谱仪（德国布鲁克光谱仪器公司）。

试验参照焦培鑫等[23]的方法，在红外烤灯照射的干燥条件下，以溴化钾（光谱纯）作为背景，将 2 mg 样品与 200 mg 溴化钾在玛瑙研钵中充分研磨、混匀并进行压片，放入光谱仪中进行读取分析。光谱采集时仪器的设定参数参照 Kim 等[24]的报道。扫描范围为 700~4 000 cm^{-1}（图 1），扫描次数为 128 次，分辨率为 4 cm^{-1}，每个样品重复装样 5 次（图 2），重复 2 遍。

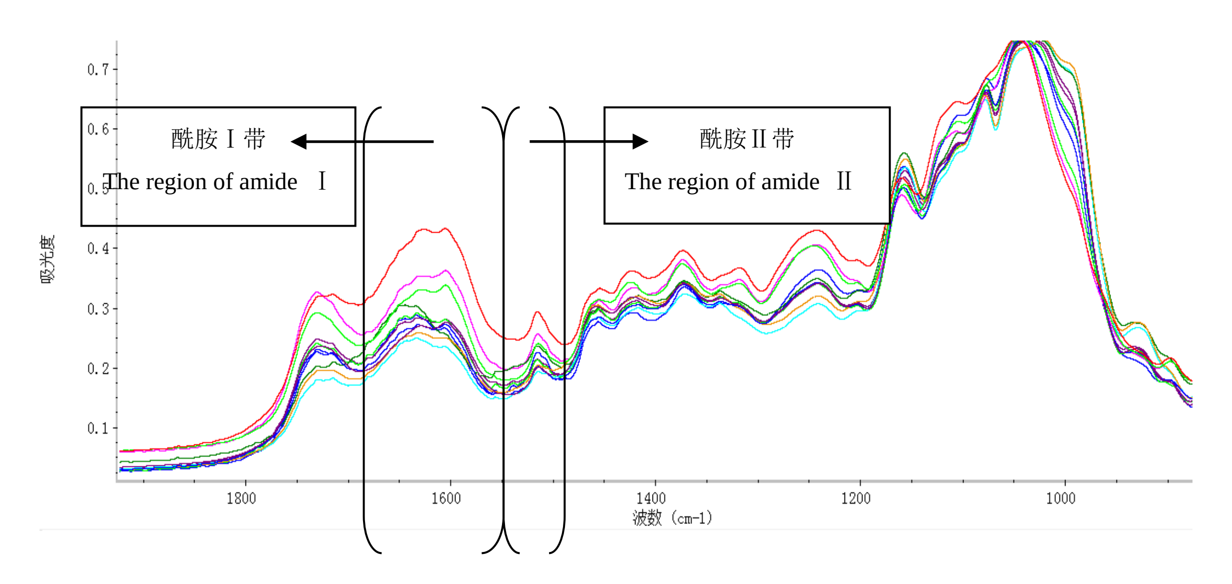


图 1　11 种玉米青贮蛋白质光谱酰胺 I 带与酰胺 II 带的区域划分

Fig.1　The region of amide Ⅰ and amide Ⅱ of FTIR protein spec spectroscopy in 11 kinds of corn silages

1.4　数据分析与计算

1.4.1　降解特性相关参数的计算

某成分瘤胃消失率（%）=100×（某成分质量－残留物中某成分质量）/某成分质量。

根据 Ørskov 等[25]提出的瘤胃动力学数学指数模型计算 $Y=a+b(1-e^{-ct})$，式中：Y 为尼龙袋在瘤胃中滞留时间 t 后营养成分的瘤胃消失率（%），a 为快速降解部分（%），b 为慢速降解部分（%），c 为慢速降解部分的降解速率（%/h），t 为瘤胃滞留时间（h），下式同。

不可降解部分的计算公式为 $u=1-(a+b)$，式中 u 为不可降解部分（%）。

饲料有效降解率的计算公式为 $ED=a+[(b\times c)/(c+k)]$，式中：k 为瘤胃外流速率，为 0.031/h[26]，ED 为有效降解率（%）。

1.4.2　中红外光谱分析

利用光谱处理软件 Ominic 8.2（Spectra tech，Madison，WI，USA）对光谱中蛋白质区域酰胺区段（1 720~1 480 cm^{-1}）进行分析，并分别对酰胺 I 带与酰胺 II 带进行基线校正。对酰胺 I 带区段进行二阶导处理，并对二阶导图谱进行平滑，然后找到原光谱对应的蛋白质

二级结构位置[27]：α–螺旋出现在 1 658~1 648 cm^{-1} 波段；β–折叠出现在 1 640~1 620 cm^{-1} 波段。本试验分别对酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带的峰高、峰面积、峰高比、峰面积比，以及蛋白质二级结构 α–螺旋、β–折叠的峰高、峰高比进行分析计算，探索玉米青贮蛋白质分子结构与其干物质、粗蛋白质以及中性洗涤纤维瘤胃降解特性是否存在相关关系。

1.4.3　数据统计与分析

用 Excel 2010 进行数据的初步整理，用 SAS 9.2 软件中的 PROC MIXED 程序对玉米青贮瘤胃降解特性中的参数（快速降解部分、慢速降解部分、慢速降解部分的降解速率、不可降解部分、有效降解率）和蛋白质分子光谱的数据（酰胺Ⅰ带、酰胺Ⅱ带的峰面积、峰高、峰面积比和峰高比，二级结构 α–螺旋、β–折叠的峰高、峰高比）进行分析，用 PROC CORR 程序分析瘤胃降解特性与蛋白质光谱数据的 Pearson 相关性（$P<0.01$、$P<0.05$、$P<0.10$ 和 $P\geq0.10$ 分别为极显著相关、显著相关、趋于相关和不相关），并用 PROC REG 程序进行多元回归分析（$R^2<0.2$、$R^2<0.4$、$R^2<0.6$ 和 $R^2>0.6$ 分别为弱拟合、中等拟合、中高度拟合和强拟合）。

2　结果与分析

2.1　瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的总体信息

2.1.1　瘤胃降解特性降解参数的信息

11 种玉米青贮瘤胃降解参数的信息见表 3。其中，干物质瘤胃降解特性快速降解部分（DM_a）为 14.86%~32.80%，干物质慢速降解部分（DM_b）为 43.58%~67.36%，干物质慢速降解部分的降解速率（DM_c）为 1.46%~4.93%，干物质不可降解部分（DM_u）为 11.75%~31.16%，干物质有效降解率（DM_{ED}）为 40.99%~54.58%。蛋白质瘤胃降解特性快速降解部分（CP_a）为 35.80%~61.02%，蛋白质慢速降解部分（CP_b）为 12.24%~46.09%，蛋白质慢速降解部分的降解速率（CP_c）为 0.85%~7.07%，蛋白质不可降解部分（CP_u）为 10.41%~44.66%，蛋白质有效降解率（CP_{ED}）为 45.85%~69.35%。中性洗涤纤维瘤胃降解特性快速降解部分（NDF_a）为 1.03%~22.70%，中性洗涤纤维慢速降解部分（NDF_b）为 46.34%~88.05%，中性洗涤纤维慢速降解部分的降解速率（NDF_c）为 1.23%~4.12%，中性洗涤纤维不可降解部分（NDF_u）为 8.81%~35.39%，中性洗涤纤维有效降解率（NDF_{ED}）为 32.98%~47.59%。其中不同地区的玉米青贮瘤胃降解参数变异较大，为后续与蛋白质分子结构的相关分析以及回归拟合提供了良好的数据支持。

表 3　玉米青贮瘤胃降解特性的数据汇总

Table 3　Summary of rumen degradation characteristics data of corn silages

项目 Items	平均值 Mean	范围 Range		
		最小值 Minimum	最大值 Maximum	标准差 SD
干物质 DM				
a/%	22.68	14.86	32.80	5.55
b/%	52.73	43.58	67.36	7.89
c/(%/h)	2.73	1.46	4.93	1.05
u/%	24.59	11.75	31.16	6.62
ED/%	46.18	40.99	54.58	4.44
粗蛋白质 CP				
a/%	45.13	35.80	61.02	7.44
b/%	22.07	12.24	46.09	9.98
c/(%/h)	3.32	0.85	7.07	1.87
u/%	32.81	10.41	44.66	9.73
ED/%	54.34	45.85	69.35	6.84
中性洗涤纤维 NDF				
a/%	11.62	1.03	22.70	7.39
b/%	64.83	46.34	88.05	11.11
c/(%/h)	2.49	1.23	4.12	0.94
u/%	23.55	8.81	35.39	9.43
ED/%	38.86	32.98	47.59	4.85

a 为快速降解部分，b 为慢速降解部分，c 为 b 的降解速率，u 为不可降解部分，ED 为有效降解率。下表同。

a, rapidly degraded part; b, slowly degraded part; c, degradation rate of b; u, none degraded part; ED, effective degradability rate. The same as below.

2.1.2 蛋白质分子结构参数的信息

11 种玉米青贮蛋白质分子结构的信息见表 4。酰胺Ⅰ带的峰面积（A_Ⅰ）范围为 4.66~11.68，酰胺Ⅱ带的峰面积（A_Ⅱ）范围为 0.39~1.00，酰胺Ⅰ带的峰高（H_Ⅰ）范围为 0.06~0.14，酰胺Ⅱ带的峰高（H_Ⅱ）范围为 0.02~0.05，α–螺旋的峰高（α）范围为 0.05~0.10，

β–折叠的峰高（β）范围为0.06~0.14，酰胺Ⅰ带、Ⅱ带的峰面积比（A_Ⅰ_Ⅱ）范围为5.53~22.02，酰胺Ⅰ带、Ⅱ带的峰高比（H_Ⅰ_Ⅱ）范围为1.72~4.34，α–螺旋和β–折叠的峰高比（α_β）范围为0.58~1.00。其中不同地区的11种玉米青贮蛋白质分子结构参数变异较大。

表4　玉米青贮蛋白质结构光谱特性的数据汇总

Table 4　Summary of protein structural characteristics data of corn silages

项目 Items	平均值 Mean	范围 Range		
		最小值 Minimum	最大值 Maximum	标准差 SD
A_Ⅰ	7.80	4.66	11.68	1.85
A_Ⅱ	0.63	0.39	1.00	0.20
H_Ⅰ	0.10	0.06	0.14	0.02
H_Ⅱ	0.03	0.02	0.05	0.01
α	0.08	0.05	0.10	0.02
β	0.10	0.06	0.14	0.02
A_Ⅰ_Ⅱ	13.58	5.53	22.02	4.80
H_Ⅰ_Ⅱ	3.15	1.72	4.34	0.73
α_β	0.84	0.58	1.00	0.11

A_Ⅰ为酰胺Ⅰ带的峰面积；A_Ⅱ为酰胺Ⅱ带的峰面积；A_Ⅰ_Ⅱ为酰胺Ⅰ带、Ⅱ带的峰面积比；H_Ⅰ为酰胺Ⅰ带的峰高；H_Ⅱ为酰胺Ⅱ带的峰高；H_Ⅰ_Ⅱ为酰胺Ⅰ带、Ⅱ带的峰高比；α为α–螺旋的峰高；β为β–折叠的峰高；α_β为α–螺旋与β–折叠的峰高比。下表同。

A_Ⅰ, peak area of amide Ⅰ; A_Ⅱ, peak area of amide Ⅱ; A_Ⅰ_Ⅱ, the ratio of amide Ⅰ peak area to amide Ⅱ; H_Ⅰ, peak height of amide Ⅰ; H_Ⅱ, peak height of amide Ⅱ; H_Ⅰ_Ⅱ, the ratio of amide Ⅰ peak height to amide Ⅱ; α, peak height of α-helix; β, peak height of β-sheet; α_β, the ratio of α-helix peak height to β-sheet. The same as below.

2.2　瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的相关性分析

2.2.1　干物质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的相关性

由表5可知，DM_a分别与A_Ⅱ呈显著负相关（r=－0.47，P=0.03），与A_Ⅰ_Ⅱ呈显著正相关（r=0.45，P=0.03），与H_Ⅰ_Ⅱ呈显著正相关（r=0.57，P=0.01）。DM_b分别与A_Ⅰ_Ⅱ趋于负相关（r=－0.37，P=0.09），与H_Ⅰ_Ⅱ呈显著负相关（r=－0.55，P=0.01）。DM_c与

H_II趋于负相关（*r*=－0.37，*P*=0.09），与 α 趋于正相关（*r*=0.37，*P*=0.09），与 α_β 呈极显著正相关（*r*=0.59，*P*=0.004）。DM_u 分别与 α 呈极显著正相关（*r*=0.59，*P*=0.004），与 β 呈趋于正相关（*r*=0.43，*P*=0.05）。DM_{ED} 分别与 A_II、H_II 呈极显著负相关（*r*=－0.61，*P*=0.003；*r*=－0.71，*P*=0.000 2），与 A_I_II 呈显著正相关（*r*=0.44，*P*=0.04），与 H_I_II 呈极显著正相关（*r*=0.61，*P*=0.003）。

表 5　玉米青贮干物质瘤胃降解特性与蛋白质结构光谱的相关性

Table 5　Correlation between rumen degradation characteristics of dry matter and protein structural characteristics of corn silages

项目	A_Ⅰ		A_Ⅱ		H_Ⅰ		H_Ⅱ		α		β		A_Ⅰ_Ⅱ		H_Ⅰ_Ⅱ		α_β	
Items	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
a/%	−0.06	0.80	−0.47	0.03	0.02	0.93	−0.36	0.10	−0.26	0.24	−0.06	0.78	0.45	0.03	0.57	0.01	−0.35	0.11
b/%	−0.27	0.23	0.30	0.18	−0.29	0.18	0.21	0.36	−0.32	0.15	−0.33	0.14	−0.37	0.09	−0.55	0.01	0.06	0.80
c/(%/h)	−0.13	0.55	−0.13	0.56	−0.22	0.32	−0.37	0.09	0.37	0.09	−0.004	0.99	−0.02	0.93	0.14	0.52	0.59	0.004
u/%	0.36	0.10	0.03	0.88	0.33	0.14	0.05	0.81	0.59	0.004	0.43	0.05	0.07	0.76	0.19	0.41	0.22	0.33
ED/%	−0.24	0.29	−0.61	0.003	−0.27	0.22	−0.71	0.000 2	−0.03	0.91	−0.14	0.53	0.44	0.04	0.61	0.003	0.15	0.51

r：相关系数 correlation coefficient；*P*：*P* 值 *P*-value。

下表同。The same as below.

2.2.2　蛋白质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的相关性

由表 6 可知，CP_a 与 α 呈显著正相关（r=0.45，P=0.04），与 H_Ⅰ_Ⅱ、α_β 趋于正相关（r=0.37，P=0.09；r=0.39，P=0.07）。CP_c 分别与 A_Ⅰ、β 趋于负相关（r=－0.38，P=0.08；r=－0.38，P=0.08），与 A_Ⅰ_Ⅱ 呈显著负相关（r=－0.46，P=0.03），与 α_β 呈显著正相关（r=0.57，P=0.01）。CP_u 分别与 A_Ⅱ 呈显著正相关（r=0.50，P=0.02），与 A_Ⅰ_Ⅱ 呈显著负相关（r=－0.48，P=0.03），与 H_Ⅰ_Ⅱ 呈显著正相关（r=0.50，P=0.02）。CP_{ED} 分别与 A_Ⅱ 趋于负相关（r=－0.40，P=0.06），与 α、H_Ⅰ_Ⅱ 趋于正相关（r=0.38，P=0.09；r=0.38，P=0.08），与 α_β 呈显著正相关（r=0.43，P=0.04）。

表 6　玉米青贮蛋白质瘤胃降解特性与蛋白质结构光谱的相关性

Table 6　Correlation between rumen degradation characteristics of crude protein and protein structural characteristics of corn silages

项目	A_Ⅰ		A_Ⅱ		H_Ⅰ		H_Ⅱ		α		β		A_Ⅰ_Ⅱ		H_Ⅰ_Ⅱ		α_β	
Items	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
a/%	0.12	0.60	－0.34	0.13	0.05	0.82	–0.23	0.30	0.45	0.04	0.16	0.49	0.33	0.13	0.37	0.09	0.39	0.07
b/%	0.10	0.65	–0.23	0.31	0.07	0.75	–0.17	0.45	–0.10	0.66	0.12	0.60	0.21	0.35	0.21	0.35	–0.36	0.10
c/(%/h)	–0.38	0.08	0.28	0.21	–0.35	0.11	0.01	0.96	–0.03	0.89	–0.38	0.08	–0.46	0.03	–0.36	0.10	0.57	0.01
u/%	–0.20	0.37	0.50	0.02	–0.12	0.61	0.36	0.10	–0.24	0.28	–0.24	0.27	–0.48	0.03	0.50	0.02	0.08	0.72
ED/%	0.01	0.97	–0.40	0.06	–0.07	0.74	–0.36	0.10	0.38	0.09	0.06	0.80	0.33	0.13	0.38	0.08	0.43	0.04

2.2.3　中性洗涤纤维瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的相关性

从表 7 可知，NDF_a 与蛋白质的分子结构无相关性（P>0.10）。NDF_b 与 H_II 趋于正相关（r=0.39，P=0.08）。NDF_c 与 H_II 呈显著负相关（r=－0.52，P=0.01），与 α_β 趋于正相关（r=0.39，P=0.08）。NDF_u 与 H_II 呈显著负相关（r=－0.46，P=0.03）。NDF_{ED} 与 α_β 呈趋于正相关（r=0.42，P=0.05）。

表 7　玉米青贮中性洗涤纤维瘤胃降解特性与蛋白质结构光谱的相关性

Table 7　Correlation between rumen degradation characteristics of neutral-detergent vs. protein structural characteristics of corn silages.

项目	A_ Ⅰ		A_ Ⅱ		H_ Ⅰ		H_ Ⅱ		α		β		A_ Ⅰ _Ⅱ		H_ Ⅰ _Ⅱ		α_β	
Items	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
a/%	–0.01	0.72	0.05	0.81	–0.08	0.71	0.01	0.96	0.17	0.45	–0.03	0.91	0.07	0.76	0.05	0.84	0.28	0.21
b/%	0.15	0.50	0.21	0.36	0.20	0.38	0.39	0.08	–0.23	0.30	0.00	0.99	–0.10	0.67	–0.30	0.18	–0.34	0.12
c/(%/h)	–0.21	0.34	–0.26	0.25	–0.26	0.24	–0.52	0.01	0.18	0.43	–0.06	0.78	0.03	0.88	0.33	0.13	0.39	0.08
u/%	–0.12	0.61	–0.28	0.20	–0.16	0.47	–0.46	0.03	0.14	0.54	0.02	0.94	0.06	0.79	0.31	0.16	0.19	0.41
ED/%	–0.15	0.51	–0.12	0.59	–0.22	0.34	–0.27	0.23	0.25	0.26	–0.02	0.93	0.15	0.51	0.21	0.35	0.42	0.05

2.3　瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的回归分析

2.3.1　干物质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的回归分析

由表 8 可知，H_Ⅰ_Ⅱ分别是拟合 DM_a 和 DM_b 回归方程的最佳自变量，决定系数 R^2 分别为 0.32 和 0.30，属中等拟合；α 是拟合 DM_u 的最佳自变量，R^2=0.34，属中等拟合；α_β 是拟合 DM_c 的最佳自变量，R^2=0.35，属中等拟合；H_Ⅱ与 DM_{ED} 拟合度较好，R^2=0.50。

2.3.2　蛋白质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的回归分析

由表 8 可知，α 可对 CP_a 进行拟合，R^2=0.20；未得到 CP_b 与蛋白质分子结构的拟合方程；α_β 可中等拟合 CP_c，R^2=0.33；H_Ⅰ_Ⅱ分别是拟合 CP_u 与 CP_{ED} 的最佳自变量，R^2 分别为 0.25 和 0.48，对 CP_{ED} 的拟合度最好。

2.3.3　中性洗涤纤维瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的的回归分析

由表 8 可知，蛋白质分子结构与 NDF_a、NDF_b 的相关性不强，故未得到拟合方程；H_Ⅱ可分别拟合 NDF_c 与 NDF_u，R^2 分别为 0.27 和 0.21；α_β 可拟合 NDF_{ED}，但拟合效果较弱，R^2=0.18。

表 8 玉米青贮瘤胃降解特性与蛋白质结构光谱的回归关系

Table 8 Regression relation between protein structural characteristics and rumen degradation characteristics of corn silages

预测变量 Predicted variables (*Y*)	回归变量 Variable selection （*x*）	回归方程 Prediction equations	决定系数 R^2	残差 RSD	*P* 值 *P*-value
干物质 DM					
a/%	H_Ⅰ_Ⅱ	Y=8.982+4.343×x	0.32	4.58	0.01
b/%	H_Ⅰ_Ⅱ	Y=71.949－6.095×x	0.30	6.73	0.01
c/(%/h)	α_β	Y=－2.019+5.683×x	0.35	0.86	0.004
u/%	α	Y=3.531+269.132×x	0.34	5.58	0.004
ED/%	H_Ⅱ	Y=58.106－353.667×x	0.50	3.15	0.000 2
粗蛋白质 CP					
a/%	α	Y=27.200+229.081×x	0.20	6.81	0.04
b/%					
c/(%/h)	α_β	Y=－5.575+10.646×x	0.33	1.68	0.01
u/%	H_Ⅰ_Ⅱ	Y=54.331－6.826×x	0.25	8.58	0.02
ED/%	H_Ⅰ_Ⅱ(x_1)、α_β（x_2）	Y=4.352+5.510×x_1+39.033×x_2	0.48	5.17	0.002
中性洗涤纤维 NDF					

a/%					
b/%					
c/(%/h)	H_II	Y=4.424－57.506×x	0.27	0.85	0.01
u/%	H_II	Y=40.446－500.980×x	0.21	8.64	0.03
ED/%	α_β	Y=23.206+18.736×x	0.18	4.42	0.05

3 讨 论

3.1 干物质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的关系

蛋白质分子结构对 DM_b 的拟合度好于 DM_a，这可能是由于 DM_a 与蛋白质分子结构的联系相对于 DM_b 更为密切。DM_c 与蛋白质分子结构的相关性与 Zhang 等[27]的结论不完全相符，该试验以空气为背景，对样品直接进行检测的原理与本文一致，其结果的差异可能是由于研究的对象不同，该文献研究的是玉米酒精糟及可溶物（DDGS）与无壳大麦组成的 5 种不同比例混合饲料与瘤胃降解特性的关系，由于饲料种类的不同，其营养价值也不一样，故所反映的蛋白质分子结构与瘤胃降解特性的相关性也可能存在差异。

干物质降解特性能与蛋白质分子结构建立联系，且部分降解特性拟合度较好的原因可能是因为其与纤维中芳香族化合物振动有关，光谱范围集中于 1 498~1 587 cm^{-1}[28]，存在于蛋白质结构光谱区域内，故二者存在一定的联系。

3.2 粗蛋白质瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的关系

蛋白质分子结构光谱特性（酰胺 I 带、II 带光谱强度、二级结构的强度、以及它们的比例）会影响粗蛋白质的品质和利用率[7,29-31]。这主要是因为蛋白质结构会影响与粗蛋白质品质和利用率有关的微生物和胃肠道消化酶的接触。所以研究蛋白质分子结构，对粗蛋白质的组成、品质、以及瘤胃降解特性极其重要。饲料的粗蛋白质瘤胃降解特性与其分子结构联系紧密[9]。

Liu 等[5]在利用漫反射红外光谱技术对六种大麦的外壳与籽粒之间不同降解特性研究时发现 CP_a 与 α－螺旋和 β－折叠的峰高比呈显著正相关，与本文结论一致，但未发现本文中提及的 CP_a 与 α－螺旋峰高显著正相关，这可能由于蛋白质来源不同、加工处理的方式不同带来的差异。Zhang 等[27]在研究中并未发现 CP_c 与 α－螺旋的峰高存在联系，与本文一致，但本文 CP_c 与 β－折叠的峰高负相关、与 α－螺旋与 β－折叠的峰高比呈显著正相关，与报道中的无相关不符。本研究中蛋白质 α－螺旋与 β－折叠的峰高比与 CP_u 无相关，与 CP_{ED} 显著正相关的结论与焦培鑫等[23]、吴鹏华等[32]、Liu 等[5]、Yari 等[33]报道的一致，说明饲料蛋白质 α－螺旋与 β－折叠的峰高比值越高，其有效降解率越高，且二者的拟合度较好。Zhang 等[34]指出 α－螺旋与 β－折叠的峰高比与蛋白质营养价值和利用率密切相关，但酰胺 I、II 带的峰面积比并不完全与之相关，本研究中未见 CP_{ED} 与酰胺 I、II 带的峰面积比的相关性，结论与 Liu 等[5]一致。

相对于大麦、燕麦、小麦来说，羽毛中含有高达 84%的 β－折叠，但蛋白质的利用率却最低，这与其 β－折叠、角蛋白含量、二硫键含量等结构特点密切相关[35]。证明植物性饲料

蛋白的营养价值，不仅与蛋白质种类、总蛋白质和氨基酸的含量密切相关，也与瘤胃中蛋白质对水解酶的敏感度有关，更与蛋白质分子的自身结构关系密切，其中 β－折叠所占比例的高低通常和饲料与胃肠道消化酶接触的多少有关。Yu[14]曾在研究不同加工方式对金黄色亚麻籽影响时发现，加热处理会使蛋白质与木质素的连接增多，增加蛋白质美拉德反应的数目，同时随蛋白质二级结构 β－折叠的比例增加，蛋白质的吸收利用也受到了影响。所以相似的蛋白质含量，若其二级结构 α－螺旋、β－折叠的比例不同，也会使饲料的降解特性有所不同[12]，其中 β－折叠的比例高通常导致饲料的营养价值低[4,7,11]。

3.3　中性洗涤纤维瘤胃降解特性与蛋白质分子结构的关系

中性洗涤纤维的瘤胃降解特性与碳水化合物光谱区域关系较为密切[36-37]，前人对于其与蛋白质分子结构的关系研究较少。本论文的结果也表明，蛋白质分子结构与中性洗涤纤维瘤胃降解特性关联较差，NDF_a 和 NDF_b 均未得出拟合方程，对 NDF_{ED} 的拟合度也较低，其微弱的关系可能同样是由于中性洗涤纤维中不被微生物利用的木质素中芳香化合物的存在，而部分与芳香化合物分子振动相关的结构受蛋白质酰胺带的干扰[38]。

4　结　论

①　利用 FTIR 技术可以获得玉米青贮蛋白质分子结构的光谱信息，并根据其与瘤胃降解特性的相关性，建立回归方程。其中，玉米青贮蛋白质分子结构中酰胺 II 带的峰高与其干物质瘤胃有效降解率极显著相关，拟合度最好；酰胺 I、II 带的峰高比和蛋白质二级结构（α－螺旋、β－折叠）的峰高比对蛋白质瘤胃有效降解率拟合度最好；玉米青贮蛋白质二级结构对中性洗涤纤维瘤胃有效降解率拟合度较弱。

② 利用 FTIR 技术可同时分析多个瘤胃降解特性，分析速度快，具有常规试验方法所不具有的优点。玉米青贮蛋白质分子结构评定部分瘤胃降解特性可行，其对干物质和蛋白质瘤胃有效降解率评定效果最好。

参考文献：

[1]　ALDERMAN G,COTTRILL B R.Energy and protein requirements of ruminants:an advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients[M].Wallingford,UK:CAB International,1993.

[2]　NRC.Nutrient requirements of dairy cattle[M].7th ed.Washington,D.C.:National Academy of Sciences,2001.

[3]　CASPER D P,MAIGA H A,BROUK M J,et al.Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows[J].Journal of Dairy

Science,1999,82(8):1779–1790.

[4] YU P,CHRISTENSEN D A,CHRISTENSEN C R,et al.Use of synchrotron FTIR microspectroscopy to identify chemical differences in barley endosperm tissue in relation to rumen degradation characteristics[J].Canadian Journal of Animal Science,2004,84(3):523–527.

[5] LIU N,YU P Q.Molecular clustering,interrelationships and carbohydrate conformation in hull and seeds among barley cultivars[J].Journal of Cereal Science,2011,53(3):379–383.

[6] YU P Q,JONKER A,GRUBER M.Molecular basis of protein structure in proanthocyanidin and anthocyanin-enhanced *Lc*-transgenic alfalfa in relation to nutritive value using synchrotron-radiation FTIR microspectroscopy:a novel approach[J].Spectrochimica Acta Part A,2009,73(5):846–853.

[7] YU P.Application of advanced synchrotron radiation-based Fourier transform infrared (SR-FTIR) microspectroscopy to animal nutrition and feed science:a novel approach[J].British Journal of Nutrition,2004,92(6):869–885.

[8] 卢雁,张玮玮,王公轲.FTIR用于变性蛋白质二级结构的研究进展[J].光谱学与光谱分析,2008,28(1):88–93.

[9] YU P Q,MCKINNON J J,CHRISTENSEN C R,et al.Using synchrotron-based FTIR microspectroscopy to reveal chemical features of feather protein secondary structure:comparison with other feed protein sources[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(24):7353–7361.

[10] YU P,MCKINNON J J,SOITA H W,et al.Use of synchrotron-based FTIR microspectroscopy to determine protein secondary structures of raw and heat-treated brown and golden flaxseeds:a novel approach[J].Canadian Journal of Animal Science,2005,85(4):437–448.

[11] DOIRON K,YU P,MCKINNON J J,et al.Heat-induced protein structure and subfractions in relation to protein degradation kinetics and intestinal availability in dairy cattle[J].Journal of Dairy Science,2009,92(7):3319–3330.

[12] SAMADI,YU P.Dry and moist heating-induced changes in protein molecular structure,protein subfraction,and nutrient profiles in soybeans[J].Journal of Dairy Science,2011,94(12):6092–6102.

[13] YU P Q.Protein molecular structures,protein subfractions,and protein availability affected

by heat processing:a review[J].American Journal of Biochemistry and Biotechnology,2007,3(2):66–86.

[14] YU P Q.Protein secondary structures (α-Helix and β-Sheet) at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviors of protein:a novel approach[J].British Journal of Nutrition,2005,94(4):655–665.

[15] DYSON H J,WRIGHT P E.Peptide conformation and protein folding[J].Current Opinion in Structural Biology,1993,3(1):60–65.

[16] KEMP W.Organic spectroscopy[M].Edinburgh:W H Freeman & Co,1991.

[17] JACKSON M,MANTSCH H H.The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure[J].Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,1995,30(2):95–120.

[18] JACKSON M,MANTSCH H.Biomedical infrared spectroscopy[M]//MANTSCH H H,CHAPMAN D.Infrared Spectroscopy of Biomolecules.New York:Wiley-Liss Inc.,1996.

[19] (美)国家科学研究委员会.奶牛营养需要[M].孟庆翔,译.北京:中国农业大学出版社,2002.

[20] AOAC.Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists[M].7th ed.[S.l.]:Association of Official Analytical Chemists,1950.

[21] VAN SOEST P J,ROBERTSON B R,LEWIS B A.Methods for dietary fiber,neutral detergent fiber,and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3583–3597.

[22] PENG Q H,KHAN N A,WANG Z S,et al.Moist and dry heating-induced changes in protein molecular structure,protein subfractions,and nutrient profiles in camelina seeds[J].Journal of Dairy Science,2013,97(1):446–457.

[23] 焦培鑫,刘大森,郑帅,等.饲料原料蛋白质二级结构对奶牛瘤胃降解特性的影响[J].饲料工业,2012,33(13):48–51.

[24] KIM S,KIM H,REUHS H,et al.Differentiation of outer membrane proteins from *Salmonellaenterica* serotypes using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics[J].Letters in Applied Microbiology,2006,42(3):229–234.

[25] ØRSKOV E R,MCDONALD I.The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J].Journal of Agricultural

Science,1979,92(2):499–503.

[26] 莫放,冯仰廉.常用饲料蛋白质在瘤胃的降解率[J].中国畜牧杂志,1995(3):23–26.

[27] ZHANG X W,YU P Q.Using ATR-FT/IR molecular spectroscopy to detect effects of blend DDGS inclusion level on the molecular structure spectral and metabolic characteristics of the proteins in hulless barley[J].Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy,2012,95:53–63.

[28] BELANCHE A,WEISBJERG M R,ALLISON G G,et al.Measurement of rumen dry matter and neutral detergent fiber degradability of feeds by Fourier-transform infrared spectroscopy[J].Journal of Dairy Science,2014,97(4):2361–2375.

[29] WETZEL D L,SRIVARIN P,FINNEY J R.Revealing protein infrared spectral detail in a heterogeneous matrix dominated by starch[J].Vibrational Spectroscopy,2003,31(1):109–114.

[30] SEGUCHI M,TAKEMOTO M,MIZUTANI U,et al.Effects of secondary structures of heated egg white protein on the binding between prime starch and tailings fractions in fresh wheat flour[J].Cereal Chemistry,2004,81(5):633–636.

[31] YU P.Molecular chemistry imaging to reveal structural features of various plant feed tissues[J].Journal of Structural Biology,2005,150(1):81–89.

[32] 吴鹏华,刘大森,仝泳,等.干酒糟及其可溶物和豆粕混合饲料蛋白质二级结构与瘤胃降解特性的关系[J].动物营养学报,2013,25(11):2763–2769.

[33] YARI M,VALIZADEH R,NASERIAN A A,et al.Protein molecular structures in alfalfa hay cut at three stages of maturity and in the afternoon and morning and relationship with nutrient availability in ruminants[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2013,93(12):3072–3080.

[34] ZHANG X,YU P.Molecular basis of protein structure in combined feeds (hulless barley with bioethanol coproduct of wheat dried distillers grains with solubles) in relation to protein rumen degradation kinetics and intestinal availability in dairy cattle[J].Journal of Dairy Science,2012,95(6):3363–3379.

[35] WARD W H,LUNDGREN H P.The formation,composition,and properties of the keratins[J].Advances in Protein Chemistry,1954,9:243–297.

[36] LAMMERS K,ARBUCKLE-KEIL G,DIGHTON J.FT-IR study of the changes in

carbohydrate chemistry of three New Jersey pine barrens leaf litters during simulated control burning[J].Soil Biology and Biochemistry,2009,41(2):340–347.

[37] STEWART D.Fourier transform infrared microspectroscopy of plant tissues[J].Applied Spectroscopy,1996,50(3):357–365.

[38] HIMMELSBACH D S,KHALILI S,AKIN D E.FT-IR microspectroscopic imaging of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems[J].Cellular and Molecular Biology,1998,44(1):99–108.

Relationship between Rumen Degradation Characteristics of Corn Silages with Protein Molecular Structures

WANG Xiaofan ZHANG Xingyi HAO Xiaoyan GAO Hong DING Xue ZHANG Yonggen* XIN Hangshu*

（*College of Animal Science and Technology of Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, *China*)

Abstract： The objective of this present research was to investigate the correlation between rumen degradation characteristics of corn silages with protein molecular structures, and the fitting equation was established. Rumen degradation rates of dry matter, crude protein and neutral detergent fiber of 11 kinds of corn silages were determined by nylon bag technique in order to calculated their degradation characteristics, and protein molecular structures (amide Ⅰ, amide Ⅱ, α-helix and β-sheet) were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results showed that: the peak height of amide Ⅱ had a very significant correlation with effective degradable rate of dry matter (r=－0.71, P＜0.01), had a significant correlation with degradation rate of slowly degraded part (r=－0.52, P＜0.05) and none degraded part (r=－0.46, P＜0.05) of neutral detergent fiber; the ratio of amide Ⅰ peak height to amide Ⅱ had a significant correlation with rapidly degraded part (r=0.57, P＜0.05) and slowly degraded part (r=－0.55, P＜0.05) of dry matter, had a significant correlation with none degraded part of crude protein (r=－0.55, P＜0.05) and tended to have a significant correlation with effective degradable rate of crude protein (r=0.38, P＜0.10); the peak height of α-helix had a very significant correlation with none degraded part of dry matter (r=0.59, P＜0.01), and a significant correlation with rapidly degraded part of crude protein (r=0.45, P＜0.05); the ratio of α-helix peak height to β-sheet had a very significant correlation with degradation rate of slowly degraded part of dry matter (r=0.59, P＜

0.01) and a significant correlation with degradation rate of slowly degraded part of crude protein (r=0.57, $P<0.05$), had a significant correlation with effective degradable rate of crude protein (r=0.43, $P<0.05$), but no correlation had been found between protein molecular structures with slowly degraded part of crude protein, rapidly degraded part and slowly degraded part of neutral detergent fiber ($P>0.10$). The equations between protein molecular structures with effective degradable rate of dry matter (R^2=0.50) and crude protein (R^2=0.48) were the best. These results preliminary indicate that, FTIR can be used to analysis the relationship between rumen degradation characteristics of corn silages with protein molecular structures and establish regression equations. With the quantitative relations, analyzing nutritional values of corn silages will be rapidly and non-destructively, thus reducing the disadvantages of environmental pollution, time-consuming and laborious in traditional chemical analysis methods.

Key words: rumen degradation characteristics; FTIR; protein molecular structures; correlation; multi-regression

---

*Corresponding authors: ZHANG Yonggen, professor, E-mail: zhangyonggen@sina.com; XIN Hangshu, associate professor, E-mail: xinhangshu@163.com (责任编辑　田艳明)